

**Reaktion isolierter Lymphozyten von
Patienten mit chronischer Polyarthrititis
mit an Sepharosepartikeln gebundenem
humanem Immunglobulin G**

Christian Czedl

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552316_0005

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. N. Zöllner

Reaktion isolierter Lymphozyten von Patienten mit chronischer
Polyarthrititis mit an Sepharosepartikeln gebundenem humanem
Immunglobulin G

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Czechl
aus
Freyung

1977

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Priv.-Doz Dr. M. Schattenkirchner
Mitberichterstatter : Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 06. 1978



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Wesen der chronischen Polyarthrit	2
2.1 Klinik	2
2.2 Ätiologie und Pathogenese	10
2.3 Immunologie	14
2.3.1 Serologie	14
2.3.1.1 Wesen des Rheumafaktors	14
2.3.1.2 Nachweismethoden des Rheumafaktors	17
2.3.1.3 Diagnostische Bedeutung des Rheumafaktors	19
2.3.2 Zelluläre immunologische Phänomene bei der chronischen Polyarthrit	20
2.3.2.1 Lymphozytentransformationstest	21
2.3.2.2 Migrationsinhibitionstest	23
2.3.2.3 Zytoadhäsivität immunglobulinbeladener Erythrozyten an isolierten Lymphozyten (Rosettenphänomen)	24
3. Problemstellung	27
4. Eigene Untersuchungen	28
4.1 Patientengut	28
4.2 Methoden	32
4.3 Ergebnisse	38

5.	D i s k u s s i o n	44
6.	Z u s a m m e n f a s s u n g	48
7.	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	50
8.	L e b e n s l a u f	54

1. Einleitung

Trotz aller Fortschritte der klinischen Chemie und Immunologie ist die chronische Polyarthrit (c.P.) auch heute noch immer eine im Wesentlichen klinisch zu definierende Krankheit.

Eine gewisse Bedeutung, auch in diagnostischer Hinsicht, erreichte der im Jahre 1940 von WAALER (1) im Serum von Patienten mit c. P. entdeckte Rheumafaktor (RF), der jedoch nicht bei allen Patienten mit c. P. und in der Regel nicht zu Beginn der Krankheit nachzuweisen ist.

In den letzten Jahren konzentrierte sich das Interesse der rheumatologischen Forschung mehr auf die zellulären Immunvorgänge, als auf serologische Untersuchungen. Es wurde festgestellt, daß isolierte Lymphozyten von Patienten mit c. P. mit dem Immunglobulin G, welches auch im serologischen Rheumafaktornachweis als Reaktant fungiert, immunologische Reaktionen zeigen.

Eine dieser Reaktionen ist das Phänomen der Zytoadhäsivität (Rosettenphänomen, BACH et al.) mit Immunglobulin beladenen menschlichen Erythrozyten. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche beschäftigen sich damit, das Phänomen der Zytoadhäsivität mit Immunglobulin beladenen Sepharosepartikeln und isolierten Lymphozyten von Patienten mit c. P. durchzuführen und eine eventuelle Korrelation zwischen dem Phänomen und der klinischen Erkrankung zu untersuchen.

5.	D i s k u s s i o n	44
6.	Z u s a m m e n f a s s u n g	48
7.	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	50
8.	L e b e n s l a u f	54

1. Einleitung

Trotz aller Fortschritte der klinischen Chemie und Immunologie ist die chronische Polyarthrit (c.P.) auch heute noch immer eine im Wesentlichen klinisch zu definierende Krankheit.

Eine gewisse Bedeutung, auch in diagnostischer Hinsicht, erreichte der im Jahre 1940 von WAALER (1) im Serum von Patienten mit c. P. entdeckte Rheumafaktor (RF), der jedoch nicht bei allen Patienten mit c. P. und in der Regel nicht zu Beginn der Krankheit nachzuweisen ist.

In den letzten Jahren konzentrierte sich das Interesse der rheumatologischen Forschung mehr auf die zellulären Immunvorgänge, als auf serologische Untersuchungen. Es wurde festgestellt, daß isolierte Lymphozyten von Patienten mit c. P. mit dem Immunglobulin G, welches auch im serologischen Rheumafaktornachweis als Reaktant fungiert, immunologische Reaktionen zeigen.

Eine dieser Reaktionen ist das Phänomen der Zytoadhäsivität (Rosettenphänomen, BACH et al.) mit Immunglobulin beladenen menschlichen Erythrozyten. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche beschäftigen sich damit, das Phänomen der Zytoadhäsivität mit Immunglobulin beladenen Sepharosepartikeln und isolierten Lymphozyten von Patienten mit c. P. durchzuführen und eine eventuelle Korrelation zwischen dem Phänomen und der klinischen Erkrankung zu untersuchen.

2. Wesen der chronischen Polyarthritidis

2.1 Klinik

Die chronische Polyarthritidis (c.P.), früher primär chronische Polyarthritidis genannt, heute auch progressiv chronische Polyarthritidis (p.c.P.) oder nach angloamerikanischer Nomenklatur Rheumatoide Arthritis, ist eine chronische, entzündliche Gelenkserkrankung, die jedoch auch Merkmale einer Systemkrankheit aufweist.

Der Beginn der Krankheit ist in typischer Weise schleichend, befallen sind vorwiegend die kleinen Gelenke, insbesondere die Fingergrund- und Mittelgelenke, sowie die Handgelenke. Charakteristisch ist weiterhin die Symmetrie des Gelenksbefalls. Im Laufe der Erkrankung können jedoch auch alle anderen Gelenke des Organismus befallen werden, einschließlich der Kiefergelenke. Es kommt aber auch in einer Anzahl von Fällen ein akuter Beginn an einzelnen großen Gelenken, z. B. den Kniegelenken vor, ein polyartikulärer Befall und Symmetrie folgen dann erst in einem späteren Stadium.

Der Verlauf der Krankheit ist sehr unterschiedlich. Häufiger findet man eine stetige Progredienz, besonders bei schleichendem Beginn. Manchmal ist der Verlauf schubartig mit zwischenzeitlich kompletten oder teilweisen Remissionen. Betroffen ist häufiger das weibliche Geschlecht. Das Verhältnis beträgt 3:1 (Frauen zu Männer).

- / -

Der Ausbruch der Krankheit kann in jedem Lebensalter erfolgen. So sind kindliche bzw. jugendliche Sonderformen der Krankheit bekannt. Während sie beim Manne in allen Altersstufen etwa gleich häufig auftritt, gibt es bei der Frau zwei Altersgipfel in der Häufigkeitskurve, nämlich im dritten und im fünften bis sechsten Lebensjahrzehnt. Dies sind einerseits die Fälle von c. P. im Anschluß an Schwangerschaften, andererseits die Fälle jenseits der Menopause.

Bei der Gelenkbeteiligung im Rahmen der c. P. handelt es sich meist um eine spindelförmige Schwellung, mit dem Entzündungszeichen Wärme, Schmerz und Bewegungseinschränkung. Neben einer Gelenkkapselverdickung stellt man häufig das Phänomen der Fluktuation als Ausdruck eines Gelenksergusses fest. Im Bereich der kleinen Gelenke ist eine 1/2 bis 3 Stunden dauernde Steifigkeit der Gelenke bei der c. P. am Morgen besonders auffällig. Im späteren Verlauf kommt es zu Gelenkszerstörung mit Subluxation, Deviation (z. B. Ulnardeviation in den Fingergrundgelenken), schließlich in einigen Fällen zu Ankylosen.

Es werden bei der c. P. jedoch nicht nur die Gelenke betroffen; sehr häufig kommt es auch zu Entzündungen z. B. der Schleimbeutel oder Sehnenscheiden.

Darüber hinaus kann es jedoch auch zu systemischen Manifestationen dieser Krankheit kommen. Allgemeine Zeichen einer Entzündungskrankheit sind in mehr oder minder ausgeprägter Form im Laufe der Erkrankung festzustellen. Dazu gehören:

Fieber, Gewichtsverlust, Müdigkeit und schnelle Erschöpfbarkeit.

Fast regelmäßig ist eine Anämie vorhanden. Häufig tritt der Befall eines oder mehrerer Organe bzw. Organsysteme auf. Als viscerale Manifestationen sind Pleuritis, interstitielle Lungenbeteiligungen, Myocardiopathien, Hepato-Spleno-Megalie (Felty-Syndrom), Nierenbeteiligung und Beteiligung der Tränen- und Speicheldrüsen (Dacryo-Sialo-Adenopathie bzw. Sjögren-Syndrom) bekannt. Rheumaknoten über den Streckseiten der Gelenke treten in 30 bis 40% der Fälle auf. Bei Befall der Sklera durch Rheumaknoten kommt es zu Skleritis, Skleromalazie und unter Umständen zum Staphylom.

Bei besonders schweren Verlaufsformen treten Vaskulitiden auf, die natürlich Symptome an den verschiedensten Organen hervorrufen können. Zu erwähnen sind hier vor allem Hautulcera, akrale Nekrosen, fokale Myokardläsionen und Neuropathien (Mononeuritis multiplex). Gefäßerkrankungen sind bei den Kollagenosen im engeren Sinne (z. B. Lupus erythematoses) jedoch wesentlich häufiger.

Als Komplikation der chronischen Polyarthritidis ist wie bei jeder chronischen Entzündungserkrankung eine Amyloidose in Betracht zu ziehen.

Sehr schwerwiegend können natürlich auch die Folgen bzw. Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie der c. P. sein. Osteoporose, Hautatrophie, Vaskulitiden, Myopathien, Magenulcera, Hypertonie und Diabetes treten häufig im Rahmen einer Corticoidbehandlung sowie Nephropathien, Hepatopathien und ebenfalls Magenulcera bei der Therapie mit verschiedenen Analgetica bzw. Antirheumatica auf. So ist nicht immer die Unterscheidung zwischen Organmanifestationen der c. P. und Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie sicher möglich. Die Diagnose der c. P. wird aufgrund der klinischen Merkmale dieser Krankheit der im Röntgenbild zu erkennenden destruktiven Veränderungen an den Gelenken (Usuren, Cysten), den

typischen Laborbefunden und dem Vorhandensein des Rheumafaktors im Serum gestellt.

Zu Beginn der Krankheit bzw. bei milden oder atypischen Verlaufsformen ist häufig nur ein Teil der typischen Symptome vorhanden. Häufig muß die Diagnose exspektativ betrachtet werden, immer ist sie per exclusionem zu sichern. Auszuschließen sind vor allem die Kollagenosen im engeren Sinne. Die American Rheumatism Association hat im Jahre 1956 eine Aufstellung der Kriterien für die Diagnose "chronische Polyarthrititis" empfohlen und einen Katalog auszuschließender Krankheiten angegeben. (Tab. 1)

Die entzündliche Aktivität des Krankheitsprozesses kann mit Hilfe des LANSBURY - INDEXES (1958), aber auch in einem semiquantitativen Score-System angegeben werden (CHALKINS 1962). LANSBURY gewinnt einen Aktivitätsindex aus folgenden Punkten:

1. Dauer der Morgensteifigkeit
2. Zeit bis zum Eintritt von Erschöpfungszeichen
3. Täglicher Aspirinbedarf
4. Griffstärke (gemessen mit einer Manschette des Blutdruckgerätes)
5. Zahl und Größe der betroffenen Gelenke (articular index)
6. B S G (nach WESTERGREN)

Die Einteilung der Aktivität der c. P. nach CHALKINS zeigt folgende Tabelle (Tab. 3)

Kriterien zur Beurteilung der Prozeßaktivität der chronischen Polyarthrit der Amer. Rheum. Assoc.

nach einem Vorschlag von CHALKINS (1962)

Grad	1	2	3	4
Morgensteifigkeit	5 Min. oder weniger	5 Min. bis 2 Std.	länger als 2 Std.	länger als 2 Std.
Erschöpfung	keine	tägliche Arbeit wird nicht unterbrochen	Ruhepause erforderlich	schnelle Erschöpfung
Schmerzen	keine	nur bei Bewegung	auch in Ruhe	Unterbrechung der Nachtruhe
Beurteilung des Befindens durch den Patienten	gut	ziemlich gut	mäßig	schlecht
Allgemeine	volle Aktivität ohne Einschränkung	überwiegend ohne Einschränkung	deutlich eingeschränkt Selbstversorgung möglich	Selbstversorgung kaum möglich
Griffstärke mmHg	200 - 300	195 - 120	115 - 70	70
Ausbreitung des Gelenkbefalls (articular index)	kein Gelenkbefall	0 - 15	51 - 100	100
BSG (mm/1 Std.)	0 - 20	21 - 40	42 - 70	70
Hb (g%)	12,5 und mehr	12,4 - 11	10,9 - 9,5	9,5
Beurteilung durch den Arzt	inaktiv	gering aktiv	aktiv	hochaktiv

Tabelle 3: Grade der Prozeßaktivität der chronischen Polyarthrit

2.2 Ätiologie und Pathogenese

Zur Ätiologie der c. P. gibt es zur Zeit drei Hypothesen:

1. Die Hypothese einer Autoimmunkrankheit
2. Die Hypothese einer genetisch bedingten Krankheit
3. Die Hypothese einer infektiösen Krankheit

MILGROM und WITEBSKY (2) fordern für eine Autoimmunkrankheit folgende Kriterien:

1. Direkter Nachweis freier, zirkulierender Antikörper, die bei Körpertemperatur aktiv sind, oder Nachweis zellgebundener Antikörper durch indirekte Methoden.
2. Kenntnis des spezifischen Antigens, gegen welches der Antikörper (Autoantikörper) gerichtet ist.
3. Möglichkeit der Herstellung von Antikörpern gegen das betreffende Antigen im Versuchstier.
4. Erzeugung pathologischer Veränderungen in entsprechenden Geweben des Versuchstieres, die denen im menschlichen Körper im Wesentlichen gleichen.
5. Übertragung der Krankheit durch ein die Antikörper enthaltendes Serum, oder durch immunologisch stimulierte Lymphozyten.

Die Hypothese einer Autoimmunkrankheit bei der c. P. bezieht sich vor allen Dingen auf das Vorhandensein des Rheumafaktors (RF) bei dieser Krankheit. Der RF erfüllt jedoch nicht alle der genannten Kriterien, insbesondere ist es bisher nicht gelungen, die Krankheit zu übertragen. Auch die Erzeugung einer Arthritis beim Ver-

suchstiere durch alteriertes Immunglobulin der Klasse G (IgG), dem möglichen Antigen des Autoantikörpers Rheumafaktor, mit allen der Erkrankung beim Menschen entsprechenden Symptomen, ist bis heute nicht möglich. Wir kennen auch noch andere Antikörper bei der c. P. die gegen körpereigene Substanzen gerichtet sind, wie z. B. antinukleäre Faktoren, Antikörper gegen Fibrin, gegen Kollagen und gegen Muskulatur. Diese Antikörper sind jedoch wie der RF nicht in jedem Falle einer c. P. vorhanden. Ebenso wenig erfüllen sie sämtliche geforderten Kriterien eines Autoantikörpers.

Eine Reihe von Autoren postulieren genetische Faktoren in der Ätiologie der c. P.. Sie berufen sich dabei hauptsächlich auf Untersuchungen bei Verwandten von Patienten mit c. P., die häufiger erkranken, bzw. häufiger den RF aufweisen, auch wenn sie nicht erkranken, als Gesunde. Die Ergebnisse genetischer Untersuchungen bei der c. P. konnten jedoch nicht einen dominanten oder rezessiven Erbmodus belegen. Die Feststellung einer familiären Häufung der c. P. ist nicht notwendigerweise mit einer genetischen Bindung verknüpft. Es könnte das gleiche Ergebnis durch Einwirken eines Umgebungsfaktors auf die Mitglieder einer Sippe eintreten.

Für die Hypothese einer infektiösen Ätiologie sprechen die Beobachtungen von Arthritiden bzw. Polyarthritiden bei verschiedenen viralen und bakteriellen Infektionskrankheiten, sowie der Nachweis von Antikörpern gegen bestimmte Erreger bei Patienten mit c. P. im Serum. Auch der RF kann durch verschiedene infektiöse Antigene im Versuchstier und beim Menschen erzeugt werden.

Schließlich ist es jedoch auch denkbar, daß die verschiedenen angeführten Hypothesen für die Ätiologie der c. P. Gültigkeit oder wenigstens teilweise Gültigkeit besitzen.

2.2 Ätiologie und Pathogenese

Zur Ätiologie der c. P. gibt es zur Zeit drei Hypothesen:

1. Die Hypothese einer Autoimmunkrankheit
2. Die Hypothese einer genetisch bedingten Krankheit
3. Die Hypothese einer infektiösen Krankheit

MILGROM und WITEBSKY (2) fordern für eine Autoimmunkrankheit folgende Kriterien:

1. Direkter Nachweis freier, zirkulierender Antikörper, die bei Körpertemperatur aktiv sind, oder Nachweis zellgebundener Antikörper durch indirekte Methoden.
2. Kenntnis des spezifischen Antigens, gegen welches der Antikörper (Autoantikörper) gerichtet ist.
3. Möglichkeit der Herstellung von Antikörpern gegen das betreffende Antigen im Versuchstier.
4. Erzeugung pathologischer Veränderungen in entsprechenden Geweben des Versuchstieres, die denen im menschlichen Körper im Wesentlichen gleichen.
5. Übertragung der Krankheit durch ein die Antikörper enthaltendes Serum, oder durch immunologisch stimulierte Lymphozyten.

Die Hypothese einer Autoimmunkrankheit bei der c. P. bezieht sich vor allen Dingen auf das Vorhandensein des Rheumafaktors (RF) bei dieser Krankheit. Der RF erfüllt jedoch nicht alle der genannten Kriterien, insbesondere ist es bisher nicht gelungen, die Krankheit zu übertragen. Auch die Erzeugung einer Arthritis beim Ver-

suchstier durch alteriertes Immunglobulin der Klasse G (IgG), dem möglichen Antigen dieses Autoantikörpers Rheumafaktor, mit allen der Erkrankung beim Menschen entsprechenden Symptomen, ist bis heute nicht möglich. Wir kennen auch noch andere Antikörper bei der c. P. die gegen körpereigene Substanzen gerichtet sind, wie z. B. antinukleäre Faktoren, Antikörper gegen Fibrin, gegen Kollagen und gegen Muskulatur. Diese Antikörper sind jedoch wie der RF nicht in jedem Falle einer c. P. vorhanden. Ebenso wenig erfüllen sie sämtliche geforderten Kriterien eines Autoantikörpers.

Eine Reihe von Autoren postulieren genetische Faktoren in der Ätiologie der c. P.. Sie berufen sich dabei hauptsächlich auf Untersuchungen bei Verwandten von Patienten mit c. P., die häufiger erkranken, bzw. häufiger den RF aufweisen, auch wenn sie nicht erkranken, als Gesunde. Die Ergebnisse genetischer Untersuchungen bei der c. P. konnten jedoch nicht einen dominanten oder rezessiven Erbmodus belegen. Die Feststellung einer familiären Häufung der c. P. ist nicht notwendigerweise mit einer genetischen Bindung verknüpft. Es könnte das gleiche Ergebnis durch Einwirken eines Umgebungsfaktors auf die Mitglieder einer Sippe eintreten.

Für die Hypothese einer infektiösen Ätiologie sprechen die Beobachtungen von Arthritiden bzw. Polyarthritiden bei verschiedenen viralen und bakteriellen Infektionskrankheiten, sowie der Nachweis von Antikörpern gegen bestimmte Erreger bei Patienten mit c. P. im Serum. Auch der RF kann durch verschiedene infektiöse Antigene im Versuchstier und beim Menschen erzeugt werden.

Schließlich ist es jedoch auch denkbar, daß die verschiedenen angeführten Hypothesen für die Ätiologie der c. P. Gültigkeit oder wenigstens teilweise Gültigkeit besitzen.

Eine Autoimmunkrankheit kann bekanntlich durch ein infektiöses Agens bei vorhandener genetischer Disposition und entsprechenden zusätzlichen prädisponierenden Faktoren ausgelöst werden.

Die Pathogenese der c. P. läßt sich an einem Schema von MÜLLER (;) verdeutlichen (Abb. 1)

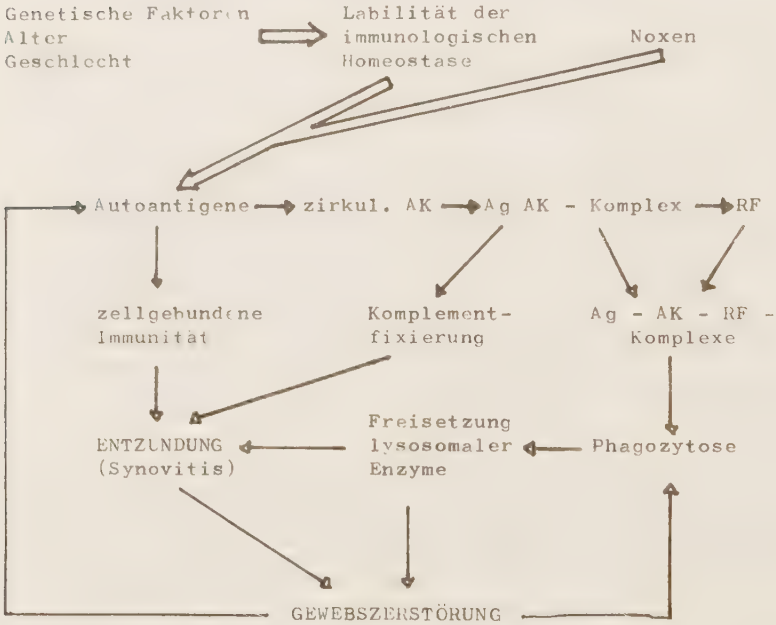


Abbildung 1: Schema der Pathogenese der c. P.
nach MÜLLER

Es führen mehrere Wege zur Entzündung (Synovitis) und Gewebszerstörung. Einerseits durch lysosomale Enzyme, welche bei der Phagozytose frei werden, andererseits durch Antigen-Antikörper-Komplement-Komplexe auf direktem Wege und über die Phagozytose durch polymorphkernige Leukozyten sowie schließlich durch die Immunozyten selbst auf dem Wege der zellgebundenen Immunität. Die Gewebszerstörung wiederum liefert Substanzen für die Phagozytose und die Stimulierung der Autoantigenproduktion, so daß sich ein circulus vitiosus schließt.

2.3 Immunologie

Die Ätiologie der c. P. ist noch unbekannt. Für jede der im Abschnitt 2.2 aufgeführten Hypothesen bezüglich Ätiologie und Pathogenese lassen sich Argumente anführen. Immunologische Prozesse spielen bei dieser Krankheit auf jeden Fall eine dominierende Rolle.

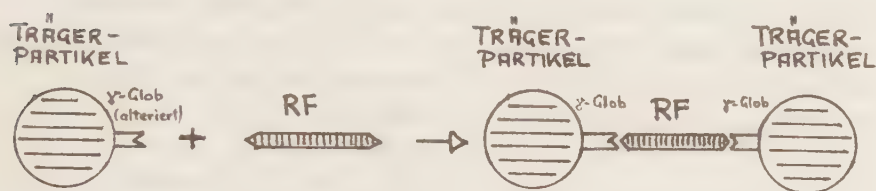
2.3.1 Serologie

Die Beschreibung eines agglutinationsfördernden Faktors bei der c. P. durch WAALER (1) im Jahre 1940 leitete eine Epoche von Untersuchungen ein, die zum Teil das Ziel hatten, die biologische Rolle dieses Antikörpers aufzuklären, zum Teil auch durch eine Reihe von Modifikationen die diagnostische Wertigkeit dieses Serumfaktors zu bestimmen.

2.3.1.1 Wesen des Rheumafaktors (RF)

WAALER betonte, daß die Agglutinationsreaktion im Serum von Patienten mit c. P. nur mit sensibilisierten Hammelerythrozyten durchführbar sei. Er stellte ferner fest, daß der agglutinierende Faktor (Rheumafaktor) bei Erwärmung des Serums auf 60 Grad Celsius für 30 Minuten noch stabil ist. Eine Erwärmung auf 70 Grad inaktivierte den agglutinierenden Faktor. Andere Autoren (MATHIES) stellten später fest, daß Erythrozyten anderer Tierarten oder mit menschlichen Erythrozyten der Agglutinationstest in analoger Weise durchgeführt werden kann, wenn die Erythrozyten sensibilisiert sind. HELLER und Mitarbeiter (4) machten im Jahre 1954 die entscheidende Entdeckung, daß Erythrozyten statt der Sensibilisierung mit Amboceptor (Antiserum gegen Erythrozyten) auch unspezifisch mit menschlichem Gammaglobulin der COHN-Fraktion II (vorwiegend Immunglobulin der Klasse G) beladen werden können und

Mit dem Rheumafaktor reagieren. Schließlich ergab die weitere Forschung, daß statt der beladenen Erythrozyten auch mit Gammaglobulin beladene Kunststoffpartikel mit RF reagieren und daß alteriertes Gammaglobulin allein mit RF präzipitiert. (5, 6) Der RF läßt sich also als ein Serumfaktor definieren, welcher mit alteriertem (hitzeaggregiertem, bzw. an die Oberfläche eines Trägerpartikels angelagertem) Gammaglobulin der Klasse G (IgG), eine Antigen-Antikörperreaktion eingeht (Abb. 2)



AGGLUTINATION



PRÄZIPITATION

Abbildung 2:

Das Prinzip der Standardnachweise für RF

KUNKEL und Mitarbeiter (7) (1959), sowie LASPALUTTO und ZIFF (8) (1959) isolierten den Rheumafaktor und stellten fest, daß er ein Immunglobulin der Klasse M (IgM) Sedimentationskonstante 19 S (S = Svedberg-Einheit) ist. Im Jahre 1961 fanden ebenfalls KUNKEL und Mitarbeiter, daß im Serum von Patienten mit c. P. auch Rheumafaktoren (Antikörper gegen Immunglobulin G) aus der Klasse A und G der Immunglobuline auftraten. Die klassische Agglutinationsreaktion wird nur durch den RF der Klasse IgM (makromolekularer Antikörper) hervorgerufen. Dieser zirkuliert im Blut als großer Komplex mit IgG (ein Molekül IgM - RF in komplexer Bindung mit 6 Molekülen IgG). Die Sedimentationskonstante dieses dissoziierbaren Komplexes beträgt 22 S

Abbildung 3 schematisiert diese Verhältnisse:

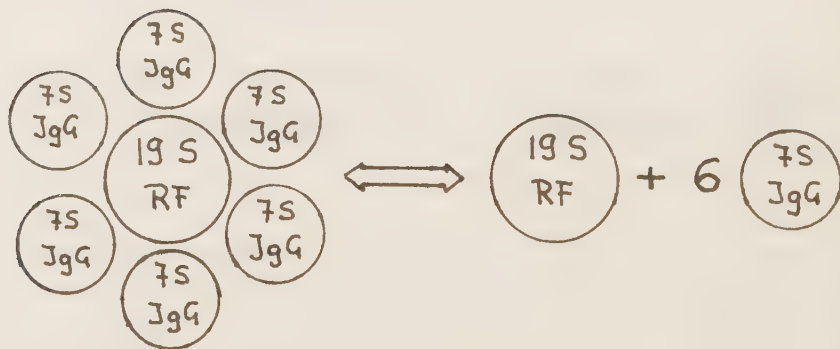


Abbildung 3: Schematische Darstellung des 22 S
RF - IgG - Komplexes

Bei Patienten mit c. P., welche hohe Titerstufen von RF (klassischer RF) in den Agglutinationstest aufweisen, finden sich gelegentlich auch Komplexe der Sedimentationskonstanten 13 (sogenannte Intermediärkomplexe). Es handelt sich hierbei um Komplexe von RF der Klasse IgG mit IgG-Molekülen.

Der RF jeder Klasse ist also ein Antikörper gegen IgG. Mit einem anderen Immunglobulin oder einem anderen Protein reagiert er nicht. Da es RF der Klasse IgM, IgG und IgA gibt, spricht man heute auch von Rheumafaktoren. Da es sich bei den Rheumafaktoren um Antikörper gegen Immunglobulin (IgG) handelt, nennt man sie neuerdings auch Antiimmunglobuline oder Antiglobuline. Das Serum jedes gesunden Individuums enthält eine geringe Menge von Antiglobulinen, die sich bei Bildung von Immunglobulinen im Rahmen von Infekten oder immunologischen Reaktionen erhöhen können. Eine Erhöhung über ein bestimmtes Maß hinaus (z. B. über eine Titerstufe von 1 : 64 im modifizierten WAALER - ROSE - TEST) wird als positiver RF beurteilt. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzmethoden (MELLORS und Mitarbeiter 1959, 1961) (9) wurde festgestellt, daß RF in Lymphknoten, Rheumaknoten und im stratum synoviale von Patienten mit c. P. vorkommt und zwar im Cytoplasma von Plasmazellen. Heute nimmt man an, daß der RF in der Plasmazelle produziert wird.

2.3.1.2 Nachweismethoden des RF

Die in der rheumatischen Routinediagnostik üblichen Nachweismethoden sind der WAALER- ROSE - Test in einer Modifikation (z. B. nach SVARTZ und SCHLOSSMANN) (10) eine Methode, bei der heterophile Antikörper vorher absorbiert werden und nach der die RF-Bestimmung bei den Patienten in der vorliegenden Untersuchung durchgeführt wurde und der Latex-Tropfen-Test (LTT), der eine Modifikation des Latexfixationstest nach SINGER und PLOTZ (11) darstellt. Der erstere

ist gewissermaßen ein spezifischerer und gleichzeitig quantitativer Nachweis des RF, der letztere ist ein relativ sensibler (häufiger im Sinne der Diagnose c. P. falsch - positiver, jedoch nie falsch - negativer) einfach durchzuführender qualitativer Nachweis. Er wird daher als screening - Test verwendet.

a) Modifizierter WAALER - ROSE - Test nach SVARTZ
und SCHLOSSMANN.

Gewaschene Hammelerythrozyten werden mit Kaninchenantikörpern gegen Hammelerythrozyten (käuferlicher Ambozeptor) in nicht agglutinierender Dosis (im Vorversuch bestimmt) beladen bzw. sensibilisiert. Polyarthritiker - bzw. Kontrollseren werden von nicht sensibilisierten Hammelerythrozyten absorbiert, um die artspezifischen Antikörper gegen Hammelerythrozyten zu entfernen. Nach der Absorption werden die zu untersuchenden Seren in Verdünnungsstufen von 1 : 4 bis 1 : 4096 dem agglutinierenden System zugesetzt. Eine Agglutination von 1 : 8 bis 1 : 32 kommt auch bei gesunden Individuen vor, d. h. geringe Mengen Antiglobulin (RF) ist auch im Serum Gesunder vorhanden. Der pathologische Bereich beginnt bei der Titerstufe 1 : 64.

b) Latex - Tropfen - Test (Latexschnelltest).

Ein Tropfen einer käuflich zu erwerbenden mit hitzeaggregiertem menschlichen IgG beladenen Latexpartikelsuspension (Teilchengröße 0,81 μ) wird auf einer dunklen Glasplatte mit einem Tropfen 1 : 20 verdünnten Patienten- bzw. Kontrollserum zusammengebracht und miteinander vermischt. Nach ein bis drei Minuten kommt es im Falle des Vorhandenseins von Antiglobulin zu einer mit bloßem Auge sichtbaren Agglutination. Bleiben die Latexpartikel homogen verteilt, so ist der Latexschnelltest negativ.

2.3.1.3 Diagnostische Bedeutung des Rheumafaktors

Wie schon erwähnt, findet sich der RF nicht in allen Fällen von c. P.. Im gesamten Krankheitsverlauf bleiben etwa 20% aller Fälle von c. P. bezüglich des RF negativ. Diese sogenannten seronegativen Fälle unterscheiden sich prinzipiell nicht von den RF-positiven. Jedoch finden sich in dieser Gruppe mehr atypische Verlaufsformen bezüglich der Art der Gelenksbeteiligung, häufiger schubartige Verlaufsformen mit geringer ausgeprägter Progredienz, Fälle mit geringerer Neigung zu Organbeteiligungen als in der größeren Gruppe der seropositiven Fälle. Der RF-Titer kann auch im Verlaufe der Krankheit so großen Schwankungen unterliegen, daß in der Phase einer Remission gelegentlich normale Titerstufen auftreten können. Im allgemeinen geht jedoch die Aktivität des Entzündungsprozesses nicht mit der Menge des im Serum vorhandenen RF parallel. Besonders zu betonen ist die Tatsache, daß der RF zu Beginn der c. P. in der Regel noch nicht vorhanden ist, d. h. in noch nicht pathologischen Titerstufen. Seine diagnostische Bedeutung ist also in der Frühphase der Krankheit sehr gering.

Meist zeigt der sensiblere LTT zuerst einen positiven Befund an, während der spezifischere WAALER - ROSE - Test erst später positiv wird. Allerdings hat der LTT auch eine wesentlich höhere Rate an im Sinne der Diagnose c. P. falsch-positiven Befunden als der WAALER - ROSE - Test.

In etwa 3% der Gesamtbevölkerung wird der RF nachgewiesen. Bei den gesunden Individuen sind häufig Verwandte von Patienten mit c. P. und ältere Personen RF-positiv. Bei einer Reihe von Krank-

heiten kommen ebenfalls erhöhte Titer von Antiglobulin (RF) vor:

Lepra	30%
Endokarditis lenta (passager)	27%
L E D	20%
Infektiöse Hepatitis	20%
Sklerodermie	18%
Lues	15%
Aktive Tuberkulose	7%

Ein Teil dieser Erkrankungen, wie z. B. die Kollagenosen oder die infektiöse Hepatitis, haben in einem beträchtlichen Prozentsatz rheumatologische Begleiterscheinungen.

Alle diese Umstände vermindern die diagnostische Wertigkeit des RF-Nachweises. In der Tabelle der Kriterien für die Diagnose der c. P. stellt der RF-Nachweis nur eines von 11 Kriterien dar. Dabei sind fünf zur Sicherung der Diagnose gefordert und eine Reihe von Ausschlußdiagnosen (Kollagenosen, Sarcoidosen etc.) zu treffen.

2.3.2 Zelluläre immunologische Phänomene bei der c. P.

An einer wesentlichen Rolle des RF in der Pathogenese der c. P. wurde mehrfach gezweifelt. Den strengen Kriterien eines Autoimmun-körpers nach WITEBSKY entspricht er ohnehin nicht (s. 2.2).

Möglicherweise spielt der RF eine Rolle bei den Exacerbationen der c. P., in dem RF-IgG-Komplexe in der Gelenkhöhle eine rege Phagozytose mit akuten Entzündungszeichen bewirken. Vielleicht ist der RF nur ein Begleitphänomen (Paraphänomen) der ablaufenden immunologischen Prozesse.

- 11 -

Deshalb hat sich in letzter Zeit das Interesse der Grundlagenforschung auf zelluläre Erscheinungen bei der c. P. konzentriert (ROTHENBERGER). Die Vorstellung, daß zellulären Immunreaktionen möglicherweise eine Bedeutung bei der Entstehung der c. P. zukommt, basierte ursprünglich auf morphologischen Befunden am erkrankten Gelenk. Das histologische Bild der entzündlich veränderten Synovialis bei der c. P. ist unter anderem gekennzeichnet durch eine betont perivaskuläre Anhäufung von Lymphozyten und Plasmazellen, die häufig einen an Lymphfollikeln mit Keimzentren erinnernden Aufbau besitzen. Neuere, insbesondere elektronenoptische Untersuchungen haben gezeigt, daß es sich dabei neben den auch bei anderen chronisch entzündlichen Prozessen vorkommenden kleineren und mittleren Lymphozyten auch um große, aktivierte Zellformen handelt.

2.3.2.1 Lymphozytentransformationstest

HUNGERFORD und Mitarbeiter (12) haben im Jahre 1959 erstmals beschrieben, daß sich kleine Lymphozyten unter dem Einfluß von Phytohämagglutinin (PHA) in große, teilungsfähige, blastenartige Zellen umwandeln können. Später wurde festgestellt, daß außer unspezifischen Stimulantien auch Antigene solche Veränderungen an in vitro gezüchteten Lymphozyten sensibilisierter Individuen bewirken können.

Blastenumwandlungen werden auch bei der Transplantationsreaktion sowie bei der experimentell ausgelösten Immun - Encephalomyelitis beobachtet. Daraus schloß man, daß es möglich sein müßte, mit Hilfe eines Lymphozytentransformationstest eine Sensibilisierung bzw. eine Antigenerkennung eines Organismus festzustellen.

Nachdem von MILS und Mitarbeitern (13) belegt werden konnte, daß die Fähigkeit von sensibilisierten Lymphozyten, sich in vitro auf spezifischen Antigenreiz in Blasten zu transformieren, als Korrelat der Allergie vom verzögerten Typ anzusehen ist, war die Methode des Transformationstests beim Studium der Pathogenese der c. P. von großem Interesse. Einige der immunologischen Phänomene bei dieser Krankheit sind als Reaktion einer Allergie vom verzögerten Typ zu charakterisieren. ROTHENBERGER und THIELE (15) untersuchten das Verhalten aus dem Blut gewonnener Lymphozyten von 33 Patienten mit chronischer Polyarthrit, in Gegenwart von homologen und analogen Synovialextrakten.

Auch SCHEIFFARTH und WARNATZ (14) führten den Lymphozytentransformationstest in einer Studie mit 50 an c. P. erkrankten Patienten mit derselben Fragestellung durch.

Die Ergebnisse beider Arbeitsgruppen waren unterschiedlich. Während SCHEIFFARTH und WARNATZ eine mittlere Transformationsrate von 17,9% feststellten, konnte ROTHENBERGER und THIELE nur eine Transformationsrate von weniger als 1% nach 72 und 120 Stunden Beobachtungszeit registrieren. Eine Rate von weniger als 1% findet man auch bei Kontrollen ohne Zusatz eines vermutlich antigenhaltigen Mediums. Bei Zusatz von PHA sind Transformationsraten zwischen 55% und 85% nach 72 Stunden zu erreichen. Da die Beurteilung des Lymphozytentransformationstest auf morphologischen Kriterien beruht und daher Schwierigkeiten in der Objektivierung gegeben sind, haben ROTHENBERGER und THIELE (15) zusätzlich die DNS-Synthese unter Verwendung von H^3 -Thymidin, die ein direktes Maß für die Transformationsrate darstellt, studiert.

Die Autoren konnten jedoch keine gesteigerte Aufnahme des Isotops in den Lymphozytenkulturen von Patienten mit c. P. unter Zusatz eines Synovialextrakts gegenüber Kontrollen nachweisen. Sie sind sich aber nicht einig, ob nicht unter verbesserten technischen Bedingungen des Tests reproduzierbare zelluläre Immunreaktionen in vitro nachzuweisen sind. Es wird z. B. darauf hingewiesen, daß das verwendete Material aus der Synovialis einen sehr rohen Extrakt darstelle. Ein zytotoxischer Effekt des verwendeten, vermutlich antigenhaltigen Materials, war jedenfalls vorher ausgeschlossen worden.

2.3.2.2 Migrationsinhibitionstest

Auch der Leukozyten - Migrations - Inhibitionstest, angegeben von BENDIXEN und SJÖBORG (16), gilt als ein in vitro-Korrelat der Allergie vom verzögerten Typ. Mit diesem Test wird gezeigt, daß die Migration von Leukozyten aus peripherem Blut sensibilisierter Individuen mit den entsprechenden Antigenen spezifisch gehemmt wird. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Eigenschaft der Leukozyten, welche in eine Kapillare eingebracht worden sind, in ein Nährmedium auszuwandern. Diese Auswanderung (Migration) wird gehemmt, wenn in das Nährmedium, in dem die Kapillaröffnung liegt, das Antigen vorhanden ist, mit dem der Organismus, von welchem die leukozytären Elemente stammen, sensibilisiert ist. Die Hemmung der Zellmigration wird durch eine lösliche Substanz, dem sogenannten Migrationsinhibitionsfaktor (MIF) bewirkt. Dieser wird unter dem Einfluß des Antigens in den sensibilisierten Zellen synthetisiert. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um ein Protein.

ROTHENBERGER und THIELE (17) fanden bei 23 Patienten mit c. P., daß homologe Synovialextrakte die Migrationsfähigkeit hemmten, während dies bei Kontrollpersonen nicht der Fall war. Für die Autoren stellen diese Ergebnisse ein Argument dafür dar, daß

zelluläre Immunreaktionen in der Pathogenese der c. P. eine Rolle spielen. Die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen und den Ergebnissen des Lymphozytentransformationstests versuchen sie mit dem Hinweis zu erklären, daß bei der c. P. die sensibilisierten Lymphozyten in ihrer überwiegenden Zahl lokal an einer Stelle haften und nicht im peripheren Blut zirkulieren. Die Anwesenheit von 2,5% sensibilisierter Lymphozyten reiche jedoch nach DAVID und Mitarbeitern (18) aus, um die Migration der gesamten in einer Kapillare enthaltenen Zellpopulation zu verhindern. Hin- gegen könnte die durch ein spezifisches Antigen in vitro induzierbare Zahl von Transformationen peripherer Lymphozyten im Bereich der normalerweise auftretenden Transformationsrate liegen.

2.3.2.3 Zytoadhäsivität immunglobulinbeladener Erythrozyten an isolierte Lymphozyten (Rosettenphänomen)

Im Bemühen um eine frühzeitige, verbesserte Diagnostik der c. P. beschrieben BACH und Mitarbeiter (19), eine Methode, die auf der Grundlage der Zytoadhäsivität von Lymphozyten an antigenbeladenen Partikeln beruht. Dabei gingen sie folgendermaßen vor: Sie isolierten Lymphozyten aus dem Blut von Patienten mit c. P. durch Sedimentation und anschließender Filtration durch eine mit Nylonwolle gefüllte Säule. Durch die Sedimentation setzten sich die Erythrozyten spontan ab. Der Überstand wurde gesammelt und die darin enthaltenen Lymphozyten mittels einer Nylonsäule isoliert. Anschließend wurden die Lymphozyten dreimal in Hank'scher-Lösung gewaschen. Die so erhaltene Suspension stellte man auf eine Konzentration von $15 \text{ mal } 10^6$ Lymphozyten/ml ein. BACH gibt an, auf diese Weise einen Reinheitsgrad von 95% und mehr Lymphozyten in der Zellsuspension erhalten zu haben. In einem weiteren Arbeitsgang wurden nun menschliche Erythrozyten der Gruppe O - Rh negativ mit inaktiviertem Antierythrozyten- serum vom Kaninchen sensibilisiert und zwar in einer Konzentration,

die gerade keine Agglutination hervorruft (subagglutinierende Dosis eines Ambozeptors).

Beide Reaktanten, die isolierten Lymphozyten sowie die sensibilisierten Erythrozyten, wurden darauf in einem bestimmten Verhältnis und bestimmter Konzentration inkubiert und das Ergebnis unter dem Mikroskop ausgewertet. BACH und Mitarbeiter setzten dabei als Grenze zwischen normalen und pathologischen Befunden sechs Rosetten pro 1000 Lymphozyten (s. Abb. 4), wobei als Rosette die Anlagerung von mehr als vier Erythrozyten an einem Lymphozyten betrachtet wurde. Dieser Wert beruht auf Beobachtung, welcher sich durch Kontrollen an gesunden Probanden ergeben hatte.

Der Vorteil dieser Methode scheint gegenüber den bisher zur Diagnostik verwendeten Tests (vor allem LTT- und WAALER-ROSE-Test) in der labormäßigen Erfassung auch seronegativer Fälle von c. P. zu liegen. So zeigte BACH, daß bei seropositiver c. P. bei 76% der Rosettentest positiv ausfiel, bei seronegativer c. P. immer noch bei 64% positiv war. Die Anzahl der abgebildeten Rosetten war bei Seropositivität insgesamt etwas höher als bei seronegativen Fällen. Auffällig war jedoch die Tatsache, daß Probanden mit hohen RF - Titern signifikant weniger Rosetten bildeten, als jene mit niedrigeren Titerstufen.

Mit Ausnahme von Patienten mit Gicht, war die Suche nach Rosetten bei 98% der Kontrollpersonen negativ.



Abbildung 4:

Rosettenbildende, sensibilisierte Erythrozyten
um einen, aus dem Blut eines an c. P. erkrankten
Patienten gewonnenen Lymphozyten.

3. P r o b l e m s t e l l u n g

Aufbauend auf die Ergebnisse in der Erforschung der zellulären immunologischen Phänomene bei der c. P. versuchten wir unter besonderer Berücksichtigung des Rosettenphänomens, eine Modifikation dieser Reaktion zu entwickeln, welche möglichst wenig Fehlerquellen aufweisen und unter Umständen als diagnostischer Test Anwendung finden sollte.

Um zu standartisierten Bedingungen zu gelangen, ersetzten wir die beim klassischen Rosettenphänomen (20) verwendeten nativen, sensibilisierten menschlichen Erythrozyten von O - Rh negativen Individuen durch inerte Sepharosepartikel. Andererseits unternahmen wir Versuche, das Phänomen der Zytoadhäsivität zu quantifizieren.

4. Eigene Untersuchungen

4. 1. Patientengut

Insgesamt wurden 62 Personen untersucht. Es handelte sich um 34 Personen mit chronischer Polyarthrititis und 28 Kontrollen. Letztere gliederten sich in 17 gesunde und 11 Patienten mit anderen rheumatischen Krankheiten auf (2 Patienten mit Spondylitis ankylosans, 3 Patienten mit Arthritis psoriatica und 6 Patienten mit Arthrosen). Von den 34 Patienten mit chronischer Polyarthrititis wiesen 26 den Rheumafaktor im Serum auf; bei 8 Patienten war der Rheumafaktor nicht nachweisbar. Sämtliche Kontrollen, sowohl die gesunden Individuen, als auch die Patienten mit anderen rheumatischen Krankheiten, hatten keinen Rheumafaktor. Eine Aufgliederung der untersuchten Fälle nach Zahl, Alter und Geschlecht zeigt Tabelle 4.

	Gesamtzahl	Geschlecht		Durchschnitts- alter
		♂	♀	
c. P. +	26	5	21	43,3
c. P. -	8	0	8	38,7
gesunde Kon- trollen	17	6	11	35,2
Spondylitis ankylosans	2	1	1	27,0
Arthritis psoriatica	3	2	1	42,3
Arthrosen	6	2	4	54,0
	62	16	46	40,9

Tab. 4: Aufgliederung der untersuchten Fälle nach Zahl, Alter und Geschlecht.

Die Patienten mit c. P. verteilten sich auf alle Stadien der Krankheit (STEINBROCKER, 21)

Tabelle 5

	c. P. +	c. P. -
Stadium I	8	6
Stadium II	12	1
Stadium III	3	0
Stadium IV	3	1
	26	8

Tab. 5: Stadienverteilung bei den untersuchten, an c. P. erkrankten Patienten nach STEINBROCKER.

Die Stadien I und II hatten allerdings ein Übergewicht, was besonders bei den rheumafaktornegativen Fällen mit c. P. ausgeprägt ist. Nur die Hälfte dieser Fälle hatte eine Verlaufsdauer von mehr als 2 Jahren, so daß von rheumafaktornegativen Fällen per definitionem gesprochen werden kann. Die andere Hälfte waren Patienten mit einer Verlaufsdauer der c. P. unter 2 Jahren, so daß in dem einen oder anderen Falle das Auftreten des Rheumafaktors noch möglich ist.

Die Einteilung der untersuchten Patienten mit c. P. nach der Aktivität des polyarthritischen Prozesses nach CHALKINS ergab sich folgendes Bild (Tabelle 6)

	c. P. +	c. P. -
Grad 1	4	2
Grad 2	8	3
Grad 3	8	2
Grad 4	6	1

Tab. 6: Verteilung der untersuchten Patienten nach der Aktivität des polyarthritischen Prozesses.

Die Behandlung der Patienten entsprach den in der Rheumatiker-Ambulanz der Medizinischen Polyklinik üblichen Richtlinien: Neben einer mehr oder minder symptomatischen medikamentösen Therapie mit analgetisch und antiphlogistisch wirksamen Substanzen (übliche Antirheumatika wie Salicylate, Indometacin, Oxyphenylbutazon, in sehr aktiven Fällen Corticosteroide) wurde ein Teil der Patienten mit rasch progredient verlaufender Krankheit mit sogenannten Basismedikamenten behandelt (Goldsalze, D-Penicillamin). Eine Aufgliederung zeigt Tabelle 7.

Nichtsteroidale Antirheumatika allein	21
Nichtsteroidale Antirheumatika + Corticosteroide	3
+ Goldsalze	2
+ D - Penicillamin	8

Tab. 7: Verteilungsschlüssel nach der aktuellen Therapie bei den an c. P. erkrankten Probanden.

Bei den Patienten, welche mit sogenannten Basismedikamenten behandelt wurden, befanden sich auch einige Fälle mit geringer Prozessaktivität. Darauf wird in der Besprechung der Ergebnisse und in der Diskussion eingegangen werden.

4.2 Methoden

Wir entnahmen jedem Probanden 20 ml Blut und verhinderten mit 1 Tropfen Heparin dessen Gerinnung. Darauf füllten wir je Probe 12 Glasröhrchen von einem Zentimeter Durchmesser mit einem Milliliter (ml) Ficoll - Isopaque - Lösung ($D = 1,0777$) und überschichteten diese vorsichtig mit je zwei ml heparinisiertem Probandenblut. Darauf wurden die Glasröhrchen 15 Minuten bei 300 g zentrifugiert, wobei sich folgendes Verteilungsbild ergab:

(Abbildung 5)

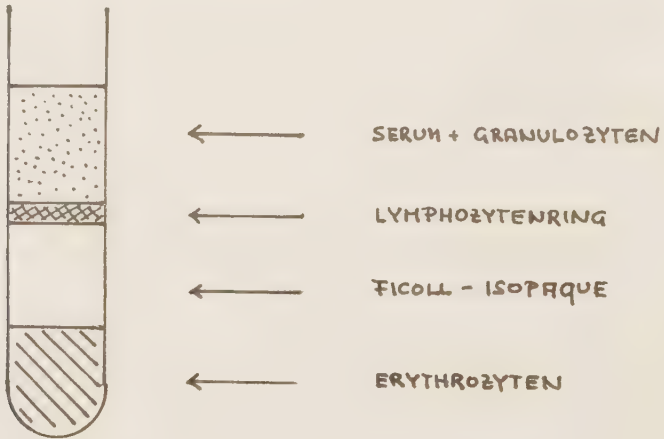


Abb. 5: Verteilung der einzelnen Blutbestandteile nach Zentrifugation mit einem Flotationsmittel.

Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe saugten wir das Serum mit den darin enthaltenen Granulozyten (=Überstand) ab, um anschließend möglichst ohne Verunreinigungen mit einer Pasteurpipette den Lymphozytenring abzuheben. Die so gewonnenen Lymphozyten kamen in ein Reagenzglas mit Hank'scher Lösung. Diese Lymphozytensuspension unterzogen wir nun einem dreimaligen Waschvorgang in Hank'scher Lösung, um eine möglichst reine

Lymphozytensuspension zu erhalten. Dabei zentrifugierten wir das die Lymphozyten enthaltende Reagenzglas je Waschvorgang 10 Min. bei 200 g, wobei die Lymphozyten absedimentierten. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Wir erhielten auf diese Weise zu 98% gereinigte Lymphozyten, die wir durch Verdünnen mit Hank'scher Lösung auf eine Konzentration von 4000 Lymphozyten/ml einstellten.

In einem dazu parallel verlaufenden Arbeitsgang führten wir die Beladung von Sepharose - Partikeln (Sepharose^R 4 B CNBr-aktiviert, Pharmacia Fine Chemicals A B Uppsala, Sweden) mit humanem IgG (Pentex^R, Human IgG, Research Products Division, Miles Laboratories, Kaukakee III 60901) durch.

Dabei gingen wir auf folgende Weise vor:

Ein Gramm Sepharose wurde mit 200 ml 10^{-3} molarer HCL-Lösung versetzt und während 15 Minuten zum Quellen gebracht. Anschließend gossen wir die so erhaltene Suspension in eine Säule mit einem Filter, der die Sepharosepartikel nicht passieren ließ, um die HCL-Lösung abtropfen zu lassen. Unterdessen wurde Human-IgG in ca. fünf Milliliter 0,1 - molarem Natriumhydrogencarbonat-Puffer, welcher 0,5 - molare NaCl-Lösung enthielt gelöst. (Pro Gramm Sepharose ca. 10 mg IgG)

Die gequollenen Sepharosepartikel wurden nun mit der IgG enthaltenen Pufferlösung zusammengebracht und bei Raumtemperatur zwei Stunden vorsichtig mit einem Magnetrührer inkubiert.

Nach Beendigung dieses Vorgangs füllten wir die jetzt mit IgG beladenen Sepharosepartikel in eine weitere Säule und spülten eventuell nicht gebundenes IgG mit oben beschriebenem Kupplungspuffer ab. Anschließend wurden noch verbliebene aktive CNBr-Gruppen mit Äthanolamin von pH 8 abgesättigt. (1 molare Äthanolaminlösung mit NaOH auf pH 8 titriert) Dieser Prozeß war ebenfalls nach zwei Stunden abgeschlossen. Nun folgten drei Waschvorgänge und zwar abwechselnd mit 0,1 - molarem Acetatpuffer von pH 4 (dieser Puffer enthält außerdem 1 - molare NaCl-Lösung), sowie 0,1 - molarem Boratpuffer vom pH 8 (enthält ebenfalls 1 - molare

NaCl-Lösung). Mit dieser Methode konnten ungefähr 90% des in Lösung befindlichen IgG's an Sepharosepartikel gebunden werden. Nach Beendigung der Waschvorgänge schwemmten wir die so beladenen Partikel in 10 ml Hank'scher Lösung auf. Nach dem selben Verfahren stellten wir eine weitere Suspension mit Sepharoseteilchen her, ohne sie jedoch mit Human-IgG zu beladen. Diese Suspension wurde zu Kontrollzwecken verwendet. Nachdem die aus den Patientenseren gewonnenen Lymphozyten alle auf die gleiche Konzentration von 4000/ml durch Verdünnung mit Hank'scher Lösung gebracht worden waren, entnahmen wir zwei ml der standardisierten Lymphozytensuspension und versetzten sie mit 200 Mikroliter unserer nach obigem Verfahren mit humanem IgG beladenen Sepharosepartikelsuspension, sowie in einem anderen Reagenzglas zwei ml standardisierte Lymphozytensuspension mit ebenfalls 200 Mikroliter unbeladenen Sepharosepartikeln, die wir zu Kontrollzwecken verwendeten.

Darauf wurden beide Proben eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten tags entnahmen wir beiden Ansätzen, nachdem sie aufgeschüttelt worden waren, eine geringe Menge Suspension und strichen sie auf einem Objektträger aus. Anschließend wurden die an 500 Sepharosepartikel gebundenen Lymphozyten unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei ergab sich im Mikroskop im Falle einer als gesichert geltenden c. P. folgendes Bild:

(Abbildung 6)



Abb. 6: Oberflächenbindung von Lymphozyten auf mit IgG beladenen Sepharosepartikeln im Lichtmikroskop.
(Etwa 200fache Vergrößerung)



Abb. 7: Oberflächenadhäsion (Rosettenphänomen) von Lymphozyten an immunglobulinbeladenen Sepharosepartikeln im Phasenkontrastmikroskop.
(Etwa 200fache Vergrößerung)

Die folgende Abbildung (Abb. 8) zeigt das oben angeführte Adhäsionsphänomen zwischen Lymphozyten und Immunglobulinen an der Oberfläche von Sepharosepartikeln im elektronenmikroskopischen Bild.



Abb. 8: Elektronenmikroskopische Darstellung der Oberflächenbindung von Lymphozyten an IgG-beladenen Sepharosepartikel (Vergrößerung 2×10^4).

4.3 Ergebnisse

Das Ergebnis der Auszählung der an Sepharosepartikel gebundenen Lymphozyten der untersuchten Patienten zeigt folgende Abbildung (Abb.9)

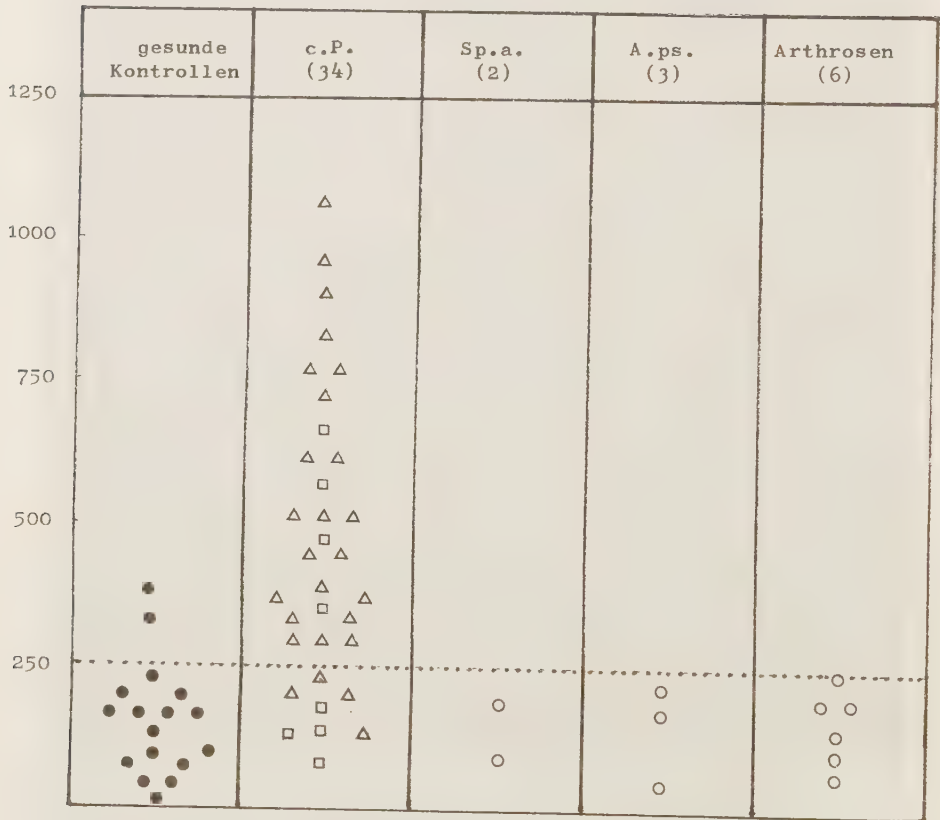


Abb. 9: Zahl der gebundenen Lymphozyten pro 500 Sepharosepartikel bei gesunden Kontrollpersonen, c. P. (seropositiv, seronegativ) Spondylitis ankylosans (Sp.a.) Arthritis psoriatica (A.ps.) und Arthrosen.

□ = seronegative c. P.

Δ = seropositive c. P.

Es fällt auf, daß bei den gesunden Kontrollen nur in zwei Fällen mehr als 250 Lymphozyten pro 500 Partikel gebunden, bei Patienten mit c. P. in 8 Fällen ebenfalls eine Bindungszahl unter 250 Lymphozyten pro 500 Partikel festgestellt wurden, bei 26 Patienten jedoch weit höhere Bindungszahlen. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß von den 8 rheumanegativen Fällen 4 unter 250 Ly/500 Sepharosepartikel lagen, 4 jedoch eine deutlich vermehrte Bindung aufweisen. Bei den Patienten mit anderen rheumatischen Krankheitsbildern (Sp. a. A. ps. und Arthrosen) fanden sich ähnliche Bindungszahlen wie bei gesunden Kontrollen.

Zur Feststellung eines Zusammenhanges der Bindungszahl mit den Krankheitsstadien bzw. der Prozeßaktivität verglichen wir die gewonnenen Resultate bei den einzelnen Gruppen miteinander. (Abb. 10 und 11)

Abbildung 10

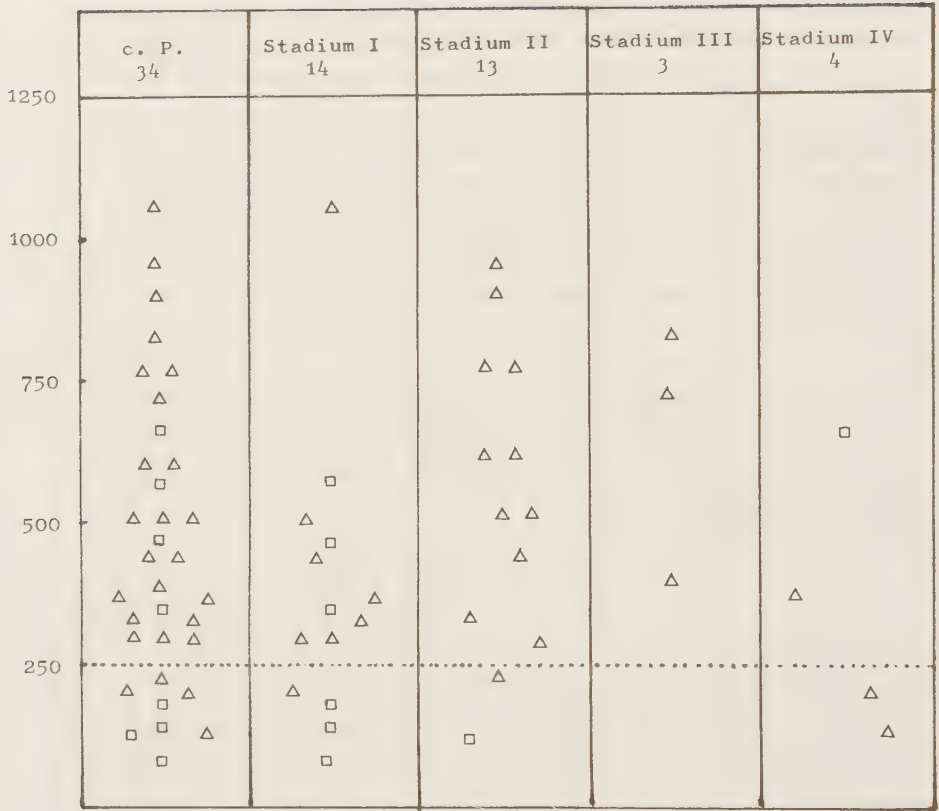


Abb. 10: Bindungszahlen in Relation zu den Krankheitsstadien

(nach STEINBROCKER)

□ = seronegative c. P.

Δ = seropositive c. P.

Abbildung 11

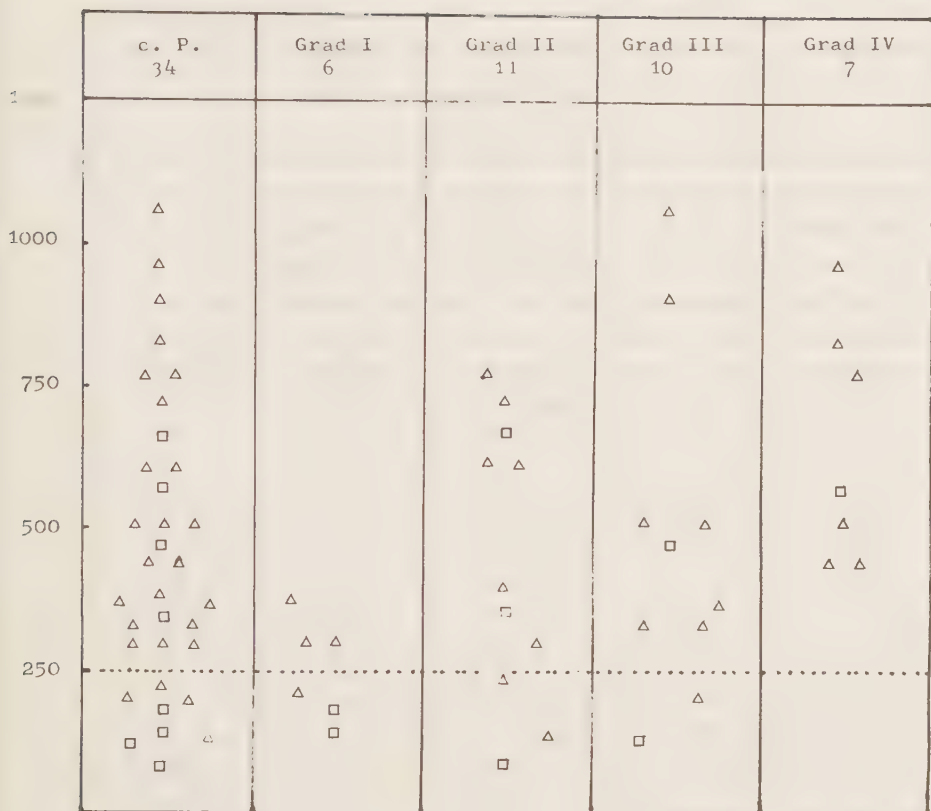


Abb. 11: Bindungszahlen im Verhältnis zur Prozeßaktivität nach CHALKINS.

□ = seronegative c. P.

△ = seropositive c. P.

Während sich zwischen Krankheitsstadien und Bindungszahl keine Unterschiede in den einzelnen Gruppen feststellen lassen, scheint eine gewisse Häufung von Fällen mit höheren Bindungszahlen in den Gruppen mit höherer Prozeßaktivität vorzuliegen.

Um in diesem Zusammenhang einen möglichen Einfluß der aktuellen Therapie bei den Patienten mit c. P. auf die Bindungszahlen festzustellen, teilten wir in einzelne Therapiegruppen ein (Abb. 12). Es zeigt sich hierbei, daß der überwiegende Teil der Fälle mit geringen Bindungszahlen (unter 250 Lymphozyten/500 Sepharosepartikel) in den Therapiegruppen Corticosteroide, Gold und D-Penicillamin zu finden sind.

Abbildung 12

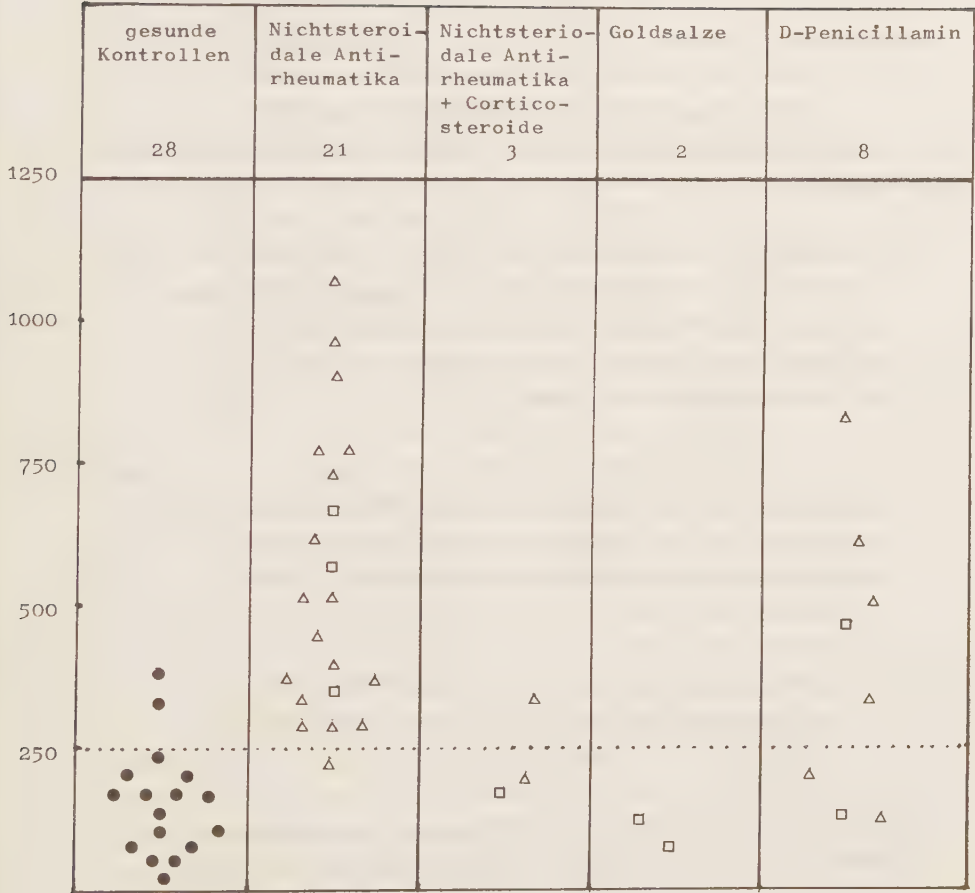


Abb. 12: Zahl der gebundenen Lymphozyten pro 500 Sepharosepartikel bei gesunden Kontrollen und Patienten mit c. P., eingeteilt nach aktueller medikamentöser Therapie.

□ = seronegative c. P. Δ = seropositive c. P.

5. Diskussion

Die gewonnenen Ergebnisse stimmen weitgehend mit den Untersuchungen von BACH et al, sowie SCHATTENKIRCHNER überein, die das sogenannte Rosettenphänomen mit sensibilisierten Erythrozyten der Blutgruppe O Rh negativ und Lymphozyten untersuchten. Daraus lassen sich folgende Tatsachen ableiten:

1. Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit c. P. haben in verstärktem Maße die Neigung, sich an mit Immunglobulinen beladene Oberflächen sowohl von Erythrozyten, als auch von inerten Partikeln wie Sepharose anzulagern.
2. Diese Eigenschaft steht in keinem erkennbaren Zusammenhang mit dem Vorhandensein des Rheumafaktors im Serum, das heißt, auch rheumafaktornegative Fälle mit c. P. reagieren in gleicher Weise wie rheumafaktorpositive.
3. Ein Zusammenhang zwischen den Krankheitsstadien und der Bindungsneigung läßt sich bei der vorliegenden Untersuchung nicht nachweisen.
4. Lymphozyten von Patienten mit höherer Entzündungsaktivität zeigen eine stärkere Bindungstendenz als Lymphozyten von Patienten mit geringerer Entzündungsaktivität.
5. Möglicherweise ist letzteres auf einen Einfluß der Therapie zurückzuführen, da nämlich eine geringere Bindungszahl bei unseren Patienten, die mit sogenannten Basistherapeutika wie Gold, D-Penicillamin und Corticosteroiden behandelt wurden, festzustellen

war, im Gegensatz zu Patienten, bei denen nur nichtsteroidale Antiphlogistica und Analgetica zur Anwendung kamen.

Gegenüber den Untersuchungen mit Erythrozyten sind bei der hier verwendeten Methode gewisse Vorteile zu sehen. Bei dem Reaktanten, also bei den mit Immunglobulin beladenen Sepharosepartikeln, handelt es sich um ein konstantes und längere Zeit haltbares Material. An der Oberfläche sind sicher keine anderen Proteine bzw. immunologisch relevanten Substanzen als diejenigen, die zur Durchführung der Reaktion in Form einer chemischen Bindung angelagert wurden. Durch die Anlagerung an eine Oberfläche wurde das gebundene IgG in einer Weise aktiviert, daß es als Reaktant für Antiglobuline (d. h. Rheumafaktoren) jeder Klasse dienen konnte.

Die technischen Schwierigkeiten der Quantifizierung, d. h. der Auszählung der gebundenen Lymphozyten beinhaltet sicher Fehlerquellen. Während beim Rosettenphänomen nach BACH die an Lymphozyten gebundenen Erythrozyten gezählt wurden, bestimmten wir die an Sepharosepartikel gebundenen Lymphozyten, wobei die Genauigkeit mit steigender Anzahl ausgezählter Partikel ähnlich wie bei der Bestimmung des Blutbildes zunimmt.

Ein Weg zur Verbesserung der Genauigkeit war der Versuch, die nicht gebundenen Lymphozyten zu zählen. Dabei bestand jedoch das Problem der Trennung, wobei wir nicht sicher sein konnten, inwieweit eine immunologisch bedingte Anlagerung durch eine Trennungsmethode wieder zerstört werden konnte. Diese Schwierigkeit bestand auch bei einem Versuch, radioaktive Elemente durch Stoffwechselvorgänge in die Lymphozyten einzubauen, um dann die Aktivität der nicht gebundenen Lymphozyten einerseits und der an Sepharose angelagerten Lymphozyten andererseits zu bestimmen.

Neben der erwähnten Schwierigkeit der Trennung, war natürlich die Stoffwechselaktivität der Lymphozyten ein nicht kalkulierbarer Faktor. Mit zunehmendem Alterungsprozeß aber auch unter dem chemischen Einfluß des Flotationsmittels sind verschieden stark schädigende Einflüsse auf die Vitalität der Lymphozyten denkbar. So blieb am Ende nur die sehr mühsame Arbeit des Auszählens unter dem Mikroskop übrig.

Bezüglich der Art der durchgeführten Reaktion wäre als Hypothese denkbar, daß es sich um eine Reaktion zwischen alteriertem IgG und einem Immunozyten handelt, der in der Lage ist, Antiglobuline (Rheumafaktoren) herzustellen und entweder den produzierten Rheumafaktor an seiner Oberfläche trägt, oder das Antigen (alteriertes IgG) als solches erkennt und mit ihm eine Verbindung eingeht.

Weiterführende Untersuchungen wären jedenfalls die Auftrennung der Lymphozytenpopulationen einerseits und Spaltung des IgG z. B. in Fab und Fc Fragmente andererseits. Es ist bekannt, daß das Fc - Fragment, welches bei Alterierung von IgG frei wird, den eigentlich antigenen Reiz zur Bildung von Antiglobulinen darstellt.

Zur diagnostischen Verwertbarkeit der durchgeführten Untersuchung ist zu sagen, daß dieses immunologische Phänomen ähnlich wie das Rosettenphänomen die Eigenschaft hat, auch bei rheumafaktornegativen Fällen häufig positiv zu sein. Bei unseren Untersuchungen ist dies bei 4 von 8 rheumafaktornegativen Patienten der Fall.

Die geringe Häufigkeit einer vermehrten Bindungszahl bei gesunden Kontrollen und anderen rheumatischen Krankheitsbildern belegt eine gewisse Spezifität für die Diagnose chronische Polyarthrititis.

Für die praktische Diagnostik dürfte jedoch sowohl das Rosettenphänomen als auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Modifikation bzw. Weiterentwicklung zu aufwendig sein.

Im Gegensatz zu BACH und Mitarbeitern zeichnet sich in unseren Untersuchungen ein Einfluß der Therapie auf den Ausfall der Lymphozytenbindung ab. Die Zahl der untersuchten Patienten ist jedoch in beiden Arbeiten zu gering, um eine verbindliche Auskunft zu geben. Außerdem wären natürlich Verlaufsbeobachtungen zur Klärung dieses Phänomens sehr nützlich.

6. Zusammenfassung

Wir haben uns in der vorliegenden Arbeit mit dem Wesen, der Ätiologie und Pathogenese der chronischen Polyarthritits beschäftigt und sind dabei vor allem auf die zellimmunologischen Phänomene bei dieser Erkrankung eingegangen.

Basierend auf den Untersuchungen von BACH et al. sowie SCHATTENKIRCHNER, die das sogenannte Rosettenphänomen - nämlich die Anlagerung von IgG beladenen menschlichen Erythrozyten der Blutgruppe O-Rh negativ an Lymphozyten von an c. P. erkrankten Patienten - beschrieben, ersetzten wir die Erythrozyten durch IgG beladene, inerte Sepharosepartikel und führten ähnliche Versuche durch.

Die Auswertung der gewonnenen Ergebnisse zeigte eine signifikante Erhöhung der Zytoadhäsivität von Lymphozyten, die aus peripherem Blut von an chronischer Polyarthritits erkrankten Patienten isoliert wurden, an mit IgG beladene Sepharosepartikel. Auf Grund dieser Tatsache könnte die in dieser Arbeit beschriebene Methode als ergänzendes Diagnostikum herangezogen werden. Leider ergaben sich bei der Quantifizierung Schwierigkeiten, sodaß die Methode für den praktischen Gebrauch zu aufwendig sein dürfte.

Insgesamt können wir folgende Punkte herausstellen:

1. Es zeigen sich signifikant höhere Bindungszahlen bei Patienten mit c. P. als bei Gesunden

2. Degenerative Erkrankungen wie z. B. Arthrosen zeigen dieses Phänomen nicht.
3. Einen gewissen Einfluß scheint die Therapie mit Corticoiden, Goldsalzen und D - Penicillamin auf die Bindungszahlen im Sinne einer Verminderung zu haben.
4. Hinsichtlich der Prozeßaktivität läßt sich ähnliches vermuten.
5. Die Krankheitsstadien spielen in diesem Zusammenhang offensichtlich keine größere Rolle.

7. Literaturverzeichnis

1. WAALER E.
On the occurrence of a factor in human serum activating
the specific agglutination of sheep blood corpuscles.
Acta path. microbiol. Scand. 17 172 (1940)
2. MILGROM F. and WITEBSKY E.
Studies on the Rheumatoid and Related Serum Factors
I Autoimmunization of Rabbits with Gamma Globulin.
J. Am. med. Ass. 174 56 (1960)
3. MÜLLER W.
Die Serologie der chronischen Polyarthritits in Pathologie
und Klinik in Einzeldarstellungen.
Bd. 12 Springer Verlag 17 - 21 (1962)
4. HELLER G. JACOBSON A. S. KOLODNY and KAMMERER W. H.
The hemagglutination test for rheumatoid arthritis.
The influence of human plasma fraction II (gamma globulin)
on the reaction.
J. Immunol. 72 66 (1954)
5. HOBSON D. and GORILL R. H.
Agglutination test for rheumatoid arthritis.
Lancet I 389 (1952)
6. EPSTEIN W. JOHNSON A. and RAGAN C.
Observations on a precipitin reaction between serum of
patients with rheumatoid arthritis and a preparation
(Cohn fraction II) of human gamma globulin.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91 235 (1956)
7. KUNKEL H. G.
Immunologic aspects of rheumatoid arthritis.
J. Chron. Dis. 10 418 (1959)

8. LOSPALUTTO J. and ZIFF M.
Chromatographic studies on the rheumatoid factor.
J. Exp. Med. 110 169 (1959)
9. MELLORS R. C. NOWOSLAWSKY A. KORNGOLD L.
Rheumatoid arthritis and the cellular origin of R. F.
Am. J. Path. 39 355 (1961)
10. SVARTZ N. and SCHLOSSMANN K.
Agglutination of sensitized sheep erythrocytes.
Am. rheum. Diss. 16 73 - 75 (1957)
11. SINGER J. M. and PLOTZ C. M.
The latex fixation test, I.
Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis.
Amer. J. Med. 21 188 (1956)
12. HUNGERFORD D. A. DONELLY A. J. NOWELL P. C. BECK S.
The chromosome constitution of a human phenotypic intersex.
Amer. J. hum. Genet. 11 215 (1959)
13. MILLS J. A.
The immunologic significance of antigen induced lymphocyte
transformations in vitro.
J. Immunol. 97 239 (1966)
14. SCHEIFFARTH F. WARNATZ H.
Lymphozytentransformationstest
Med. Klin. 36 1808 (1968)
15. ROTHENBERGER W. und THIELE H. G.
In vitro Studie zur Pathogenese der p. c. P. mittels des
Lymphozytentransformationstests.
Kli. Wo. 48 518 - 520 (1970)

16. BENDIXEN G.
Specific inhibition of the in vitro migration of
lymphocytes in ulcerative colitis and Crohn's disease.
Scand. J. Gastroent. 2 215 (1967)
17. ROTHENBERGER und THIELE
In vitro Studie zur Pathogenese der p. c. P. mittels
des Migrations - Inhibitions - Tests.
Kli. Wo. 21 1308 - 1311 (1970)
18. DAVID J. R. AL-ASHARI S. LAWRENCE H. S. THOMAS L.
Delayed hypersensitivity in vitro
I The specific of inhibition of cell migration by
antigens
J. Immunol. 93 264 (1964)
19. BACH J. F. DEBRIEU F. DELBARRE F.
The Rheumatoid Rosette
A Diagnostic Test Unifying Seropositive and Seronegative
Rheumatoid Arthritis.
Amer. J. of Med. 49 213 - 221 (1970)
20. SCHATTENKIRCHNER M.
Frühdiagnose der chronischen Polyarthritits
Wertigkeit klinischer, serologischer und immunologischer
Untersuchungen.
136. Kolloquium der med. Fak. der Universität München
12. 07. 1972.
21. STEINBROCKER O. TRAEGER C. H. and BATTERMANN R. C.
Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis
J. Amer. Med. Assoc. 140 659 - 662 (1949)
22. CHALKINS E.
Semi-quantitative criteria for estimating degrees of
disease activity of rheumatoid arthritis.
Committee report to Amer. Rheum. Assoc. Juni 1962.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei Herrn
Priv. Doz. Dr. M. Schattenkirchner
für die Überlassung des Themas und die stets freundliche
Unterstützung

8. Lebenslauf

Ich wurde am 8. August 1943 als Sohn des Prokuristen Johann Czechl und dessen Ehefrau Elisabeth, geborene Zimmerler, in Aussig an der Elbe geboren.

In den Jahren 1949 bis 1953 besuchte ich die Volksschule in Freyung und anschließend die Oberrealschule in Passau, wo ich 1963 mit dem Abitur abschloß.

Im Oktober des gleichen Jahres wurde ich für zwölf Monate zum Militärdienst eingezogen und als Fahnenjunker der Reserve entlassen.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität München. Nach einer Studienunterbrechung von dreieinhalb Jahren, schloß ich die Ausbildung im Juni 1975 mit dem Staatsexamen ebenfalls an der Universität München ab.

Am 8. August 1975 vermählte ich mich mit Fräulein Elfriede Maurer.

Meine berufliche Tätigkeit begann ich als Medizinalassistent im Kreiskrankenhaus Vilshofen am 15. Oktober 1975 und wechselte nach sieben Monaten in das Kreiskrankenhaus Rotthalmünster.

Am 14. Oktober 1976 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Seit dem 1. November 1976 bin ich als Stationsarzt in der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Günzburg tätig.

